UNIVERSITAT DE BARCELONA

Técnicas de Biología Molecular y Genética aplicadas a la resolución de casos forenses: pasado, presente y futuro

Facultad de Farmacia

Barcelona , 5 de abril de 2016

GOBIERNO DE ESPAÑA MINISTERIO DE JUSTICIA INT CIENCIAS FORENSES

Manuel Crespillo (manuel.crespillo@justicia.es)

¿Qué es la Genética forense?

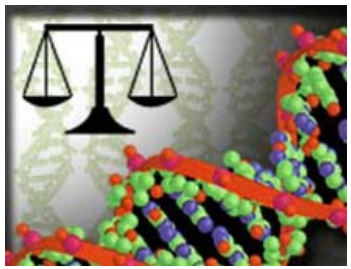
La Medicina Forense, una disciplina de la Medicina que auxilia y da soporte a los Tribunales de Justicia en su labor diaria

- Psiquiatría Forense
- Toxicología Forense
- Patología Forense
- Tanatología Forense
- …

} Médico Forense

- **CRIMINALÍSTICA**
  - **GENÉTICA FORENSE**
    o
    BIOLOGÍA FORENSE

Desde 1985



¿Ciencia o ficción?

Los forenses de 'C.S.I.' arrasan en audiencia desde que llegaron a España

LO MENOS CREÍBLE, LA RAPIDEZ DE LAS PRUEBAS DE ADN

Los forenses de EEUU están hartos de 'C.S.I.'

Los norteamericanos se creen al pie de la letra lo que sucede en la serie y piensan que los casos se resuelven en una hora

RAMÓN BORREGUERO

DEMASIADO RÁPIDOS Y EFICACES

- ✓ Interés creciente por la ciencia aplicada
- ✓ Esta generando ante Tribunales de Justicia, Jurados populares y la propia sociedad, falsas expectativas sobre la utilidad de la prueba y su eficiencia.

¿Qué resuelve la Genética forense?

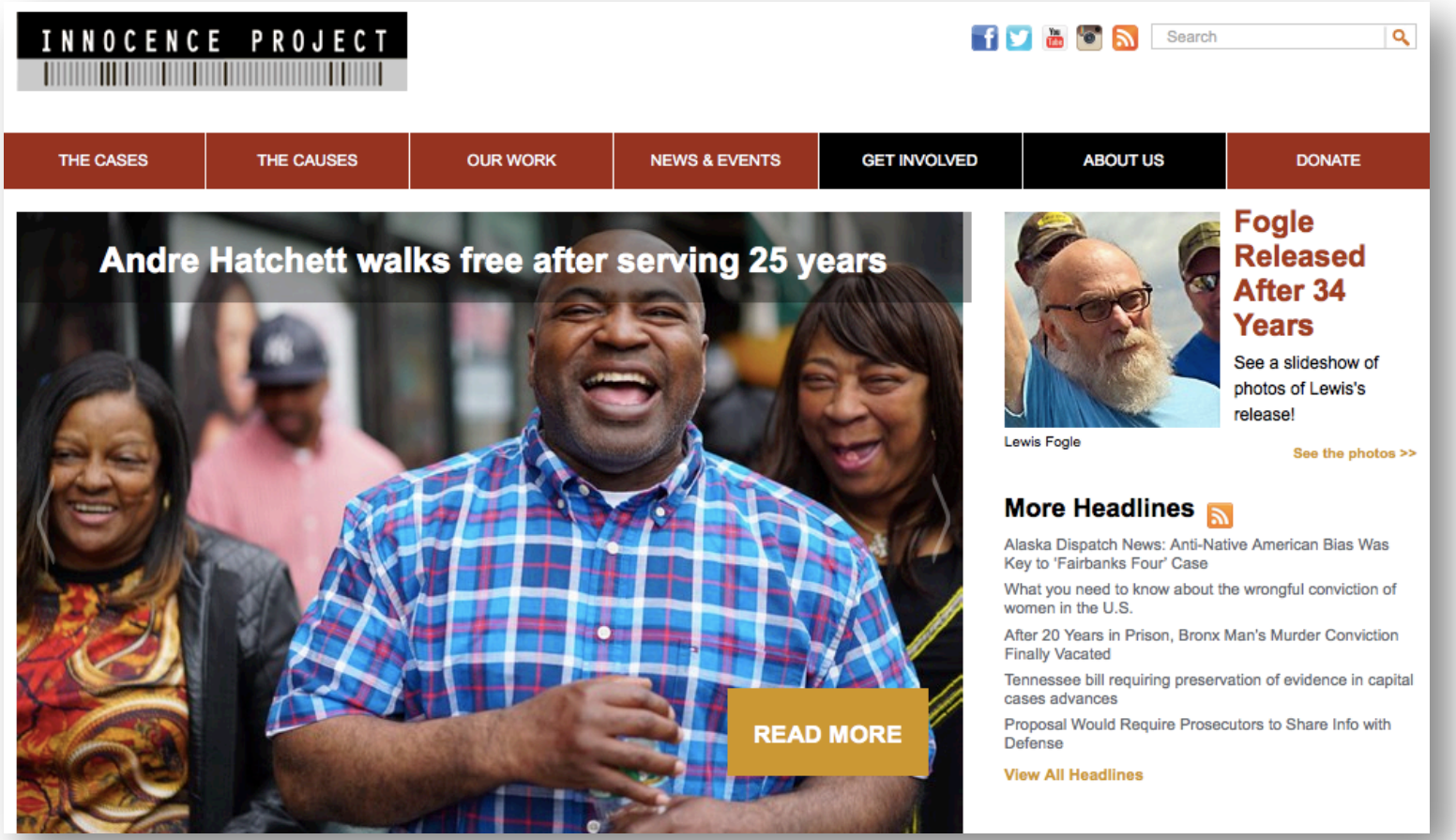
1. Investigación de indicios biológicos en criminalística (agresiones sexuales, homicidios, robos, secuestros…)

2. Investigación biológica de la paternidad y otros parentescos

3. Resolución de problemas de identificación. (grandes catástrofes, cadáveres desaparecidos, autenticidad de personas).

4. Exculpar a presos equivocadamente inculpados.

¿Qué resuelve la Genética forense?



http://www.innocenceproject.org 30/03/2016

337
Number of DNA Exonerations

14
Average Number of Years Served

140
Number of Real Perpetrators Found

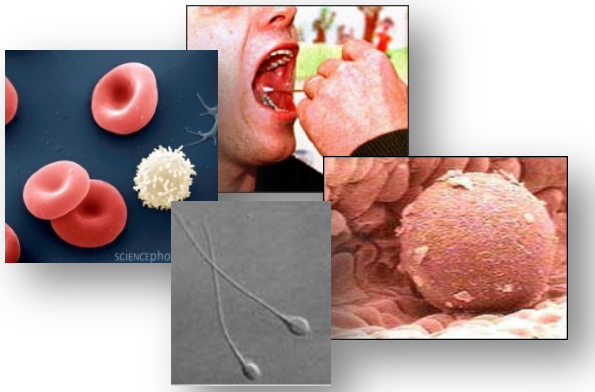
¿Qué resuelve la Genética forense?

5. Resolución de casos históricos.

6. Identificación de especies (citocromo b)

7. Microbiología forense (antrax,

El patrimonio genético: características

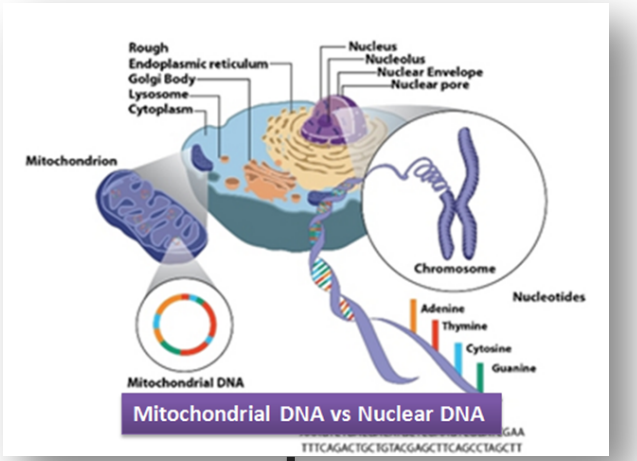


Universal: Todas las células del mismo individuo tienen un mismo ADN.

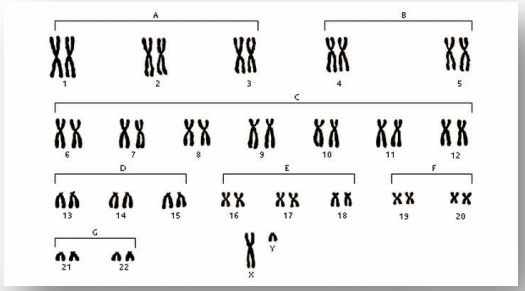
Individual: Cada persona tiene un ADN “exclusivo”

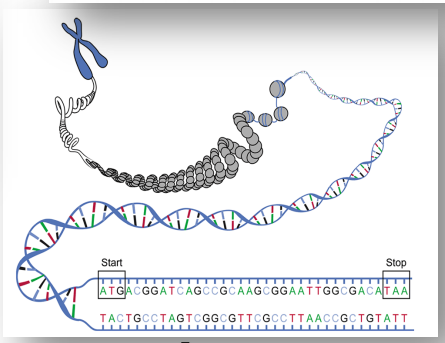
Herencia a partir de los progenitores

El patrimonio genético: características



Variedad: Distintos "tipos" de ADN por célula

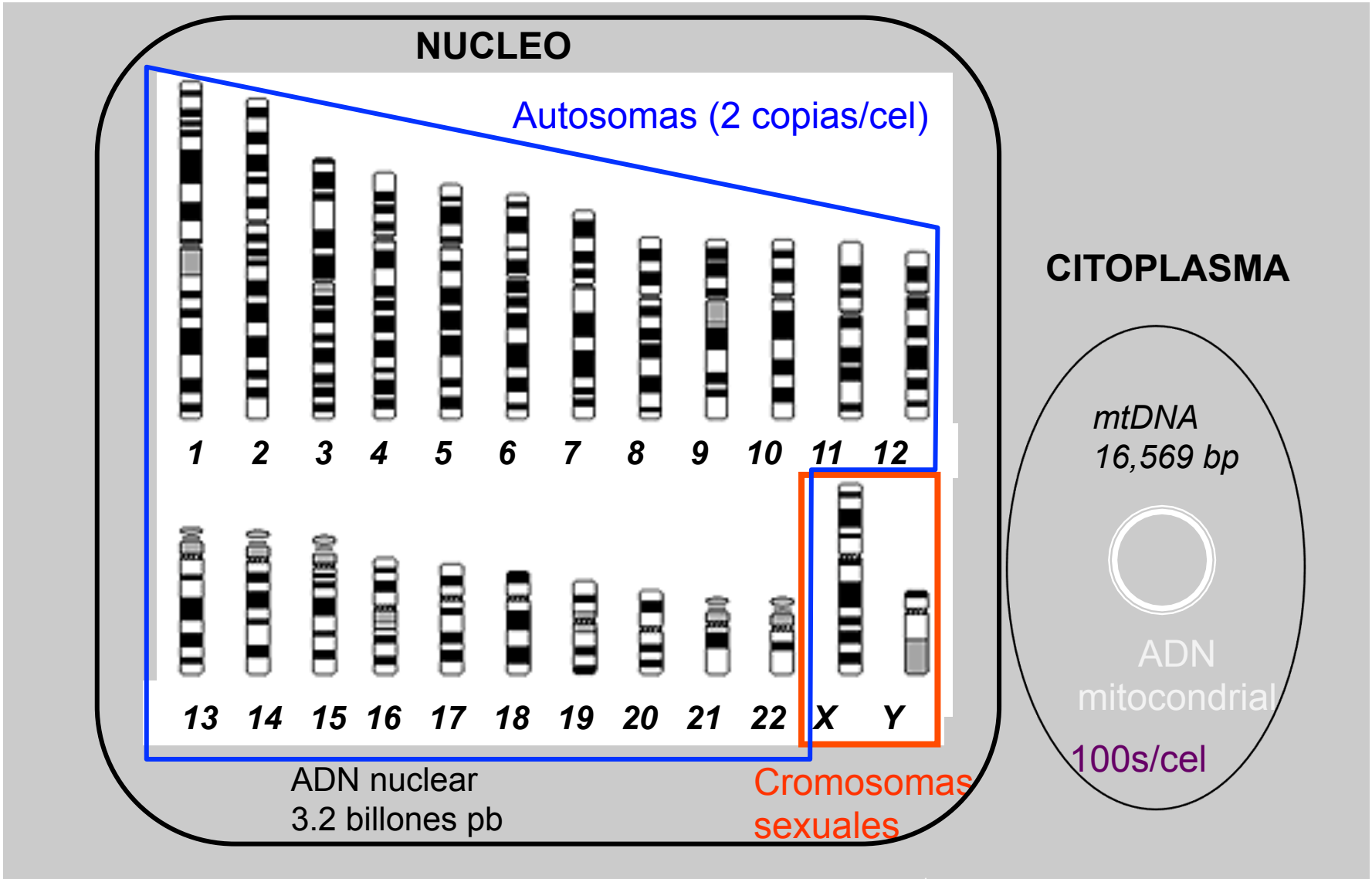




ADN muy empaquetado (cromosomas). Aprox 2m (3.000 M pb).

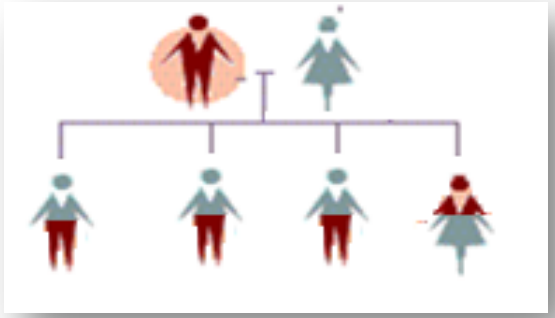
Herencia: Distintos "tipos" de herencia.

El patrimonio genético



Tipos de herencia

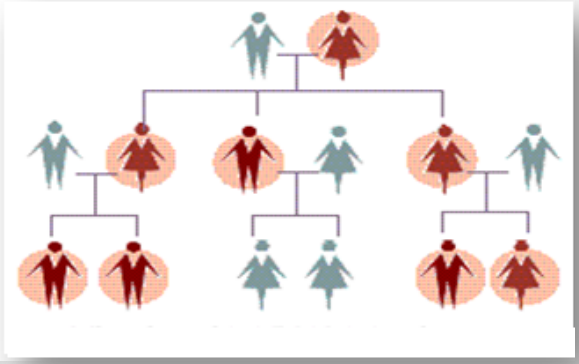
ADN autósomico



Herencia compartida

- ✓ Alta discriminación
- ✓ Individualiza

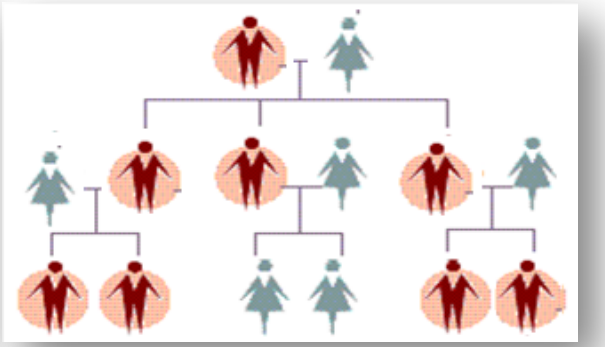
ADNmt



Herencia exclusivamente materna

- ✓ Baja discriminación
- ✓ No Individualiza

Cromosoma Y



Herencia exclusivamente paterna

- ✓ Baja discriminación
- ✓ No Individualiza

El comienzo

GOBIERNO DE ESPAÑA MINISTERIO DE JUSTICIA

INTCF CIENCIAS FORENSES

Regiones hipervariables repetitivas (1986)

Received 21 September 1984; accepted 7 January 1985.

1. Bougault, H., Cande, S. C., Schilling, J.-G., Turcotte, D. L. & Olson, P. *Nature* **305**, 278–279 (1983).
2. Richter, F. M. & Ribe, N. M. *Earth planet. Sci. Lett.* **43**, 212–222 (1979).
3. Olson, P., Yuen, D. A. & Balsiger, D. *J. geophys. Res.* **89**, 425–436 (1984).
4. Davies, G. F. *Nature* **290**, 208–213 (1981).
5. Sleep, N. H. *J. geophys. Res.* **89**, 10029–10041 (1984).
6. Morgan, W. J. *Nature* **230**, 42–43 (1971).
7. Schilling, J.-G. *Nature* **242**, 565–571 (1973).
8. Hart, S. R., Schilling, J.-G. & Powell, J. L. *Nature* **246**, 104–107 (1973).
9. Sun, S.-S., Tatsumoto, M. & Schilling, J.-G. *Science* **190**, 143–147 (1975).
10. Schilling, J.-G. & Noe Nygaard, A. *Earth planet. Sci. Lett.* **24**, 1–14 (1974).
11. Morgan, W. J. *J. geophys. Res.* **83**, 5355–5360 (1978).
12. Schilling, J.-G., Kingsley, R. & Devine, J. D. *J. geophys. Res.* **87**, 5593–5610 (1982).
13. Verma, S. P. & Schilling, J.-G. *J. geophys. Res.* **87**, 833–856 (1982).
14. Verma, S.P., Schilling, J.-G. & Waggoner, D. G. *Nature* **306**, 654–657 (1983).
15. Schilling, J.-G., Thompson, G., Kingsley, R. & Humphris, S. *Nature* **313**, 187–191 (1985).
16. Vink, G. E. *J. geophys. Res.* **87**, 9949–9959 (1984).
17. Schilling, J.-G. *et al. Am. J. Sci.* **283**, 510–586 (1983).
18. Neumann, E.-G. & Schilling, J.-G. *Contrib. Miner. Petr.* **85**, 209–223 (1984).
19. Schilling, J.-G. *Trans. Am. geophys. Un.* **58**, 535 (1977).
20. Schilling, J.-G., Vollmer, R. & Bergeron, M. *Trans. Am. Geophys. Un.* **61**, 405 (1980).
21. Morgan, W. J. *The Sea* **7**, 443–487 (1981).
22. Morgan, W. J. *Tectonophysics* **94**, 123–139 (1983).
23. Duncan, R. A. *Tectonophysics* **74**, 29–42 (1981).
24. Duncan, R. A. *J. geophys. Res.* **89**, 9980–9990 (1984).
25. Minster, J. B. & Jordan, T. H. *J. geophys. Res.* **83**, 5331–5354 (1978).
26. Vogt, P. R. *Earth planet. Sci. Lett.* **29**, 309–325 (1976).
27. Anderson, R. N., McKenzie, M. & Sclater, J. G. *Earth planet. Sci. Lett.* **18**, 391–407 (1973).
28. Waggoner, D. G., Vollmer, R. & Schilling, J.-G. *Trans. Am. geophys. Un.* **62**, 423 (1981).
29. Rideout, M. L. & Schilling, J.-G. *IPOD Initial Rep.* **82** (in the press).

Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA

Alec J. Jeffreys*, Victoria Wilson* & Swee Lay Thein†

* Department of Genetics, University of Leicester, University Road, Leicester LE1 7RH, UK
† MRC Molecular Haematology Unit, Nuffield Department of Clinical Medicine, John Radcliffe Hospital, Headington, Oxford OX3 9DU, UK

The human genome contains many dispersed tandem-repetitive 'minisatellite' regions detected via a shared 10–15-base pair 'core' sequence similar to the generalized recombination signal (χ) of Escherichia coli. *Many minisatellites are highly polymorphic due to allelic variation in repeat copy number in the minisatellite. A probe based on a tandem-repeat of the core sequence can detect many highly variable loci simultaneously and can provide an individual-specific DNA 'fingerprint' of general use in human genetic analysis.*

DNA POLYMORPHISMS have revolutionized human genetic analysis and have found general use in antenatal diagnosis[1], mapping of human linkage groups[2,3], indirect localization of genetic disease loci by linkage[2,4,5] and analysis of the role of mitotic nondisjunction and recombination in inherited cancer[6–9]. Single-copy human DNA probes are used normally to detect restriction fragment length polymorphisms (RFLPs), most of which result from small-scale changes in DNA, usually base substitutions, which create or destroy specific restriction endonuclease cleavage sites[10,11]. As the mean heterozygosity of human DNA is low (~0.001 per base pair)[10–12], few if any restriction endonucleases will detect a RFLP at a given locus, although the probability of detection is improved for enzymes such as *Msp*I and *Taq*YI which contain the mutable CpG doublet in their recognition sequence[13]. Even when detected, most RFLPs are only dimorphic (presence or absence of a restriction endonuclease cleavage site) with a heterozygosity, determined by allele frequencies, which can never exceed 50% and which is usually much less. As a result, all such RFLPs will be uninformative in pedigree analysis whenever critical individuals are homozygous.

Genetic analysis in man could be simplified considerably by the availability of probes for hypervariable regions of human DNA showing multiallelic variation and correspondingly high heterozygosities. The first such region was isolated by chance by Wyman and White[14] from a library of random segments of human DNA. The structural basis for multiallelic variation at this locus is not yet known. Subsequently, and again by chance, several other highly variable regions have been discovered near the human insulin gene[15], α-related globin genes[16–18] and the c-Ha-*ras*-1 oncogene[19]. In each case, the variable region consists of tandem repeats of a short sequence (or 'minisatellite') and polymorphism results from allelic differences in the number of repeats, arising presumably by mitotic or meiotic unequal exchanges or by DNA slippage during replication. The resulting minisatellite length variation can be detected using any restriction endonuclease which does not cleave the repeat unit and provides for such loci a set of stably inherited genetic markers.

We have described previously a short minisatellite comprised of four tandem repeats of a 33-base pair (bp) sequence in an intron of the human myoglobin gene (ref. 20; Fig. 1). The 33-bp repeat showed some similarity in sequence to three other hypervariable human minisatellites characterized previously and on the basis that the myoglobin minisatellite was flanked by a 9-bp direct repeat characteristic of the target site duplications generated by transposable elements, we suggested that this minisatellite and some other hypervariable regions were related via transposition. We show here that the myoglobin 33-bp repeat is indeed capable of detecting other human minisatellites, some of which are highly polymorphic. These regions, however, are not related by transposition, but instead share a common short 'core' sequence in each repeat unit, which in turn provides a powerful probe for hypervariable regions.

Probe for variable human DNA

A pure repeat probe was prepared from the human myoglobin minisatellite by purification of a single 33-bp repeat element followed by head-to-tail ligation and cloning of the resulting polymer into pUC 13 (ref. 21; Fig. 1). Cleavage of one of the resulting recombinants, pAV33.7, with *Bam*HI plus *Eco*RI released a 767-bp DNA insert comprised almost entirely of 23 repeats of the 33-bp sequence.

Low stringency hybridization of this repetitive insert to human DNA digested with restriction endonuclease *Eco*RI detected numerous cross-hybridizing DNA fragments, some of which showed signs of polymorphic variation (data not shown). To improve the detection of polymorphisms, the hybridization was repeated with human DNA digested with *Hin*fI or *Hae*III, both of which cleave at a 4-bp sequence not present in the 33-bp repeat sequence and which should release minisatellites in relatively small DNA fragments whose size will reflect more closely the number of repeats per minisatellite. As shown in Fig. 2, the repetitive probe detected multiple DNA fragments in human DNA as well as the parent DNA fragment from the human myoglobin gene. The larger DNA fragments (in the range 2–6 kilobases (kb) and substantially larger than the mean DNA fragment size of ~0.3 kb in human DNA digested with *Hin*fI or *Hae*III) in particular showed variation between the three individuals examined; these variants were transmitted apparently in a Mendelian fashion, in that each polymorphic

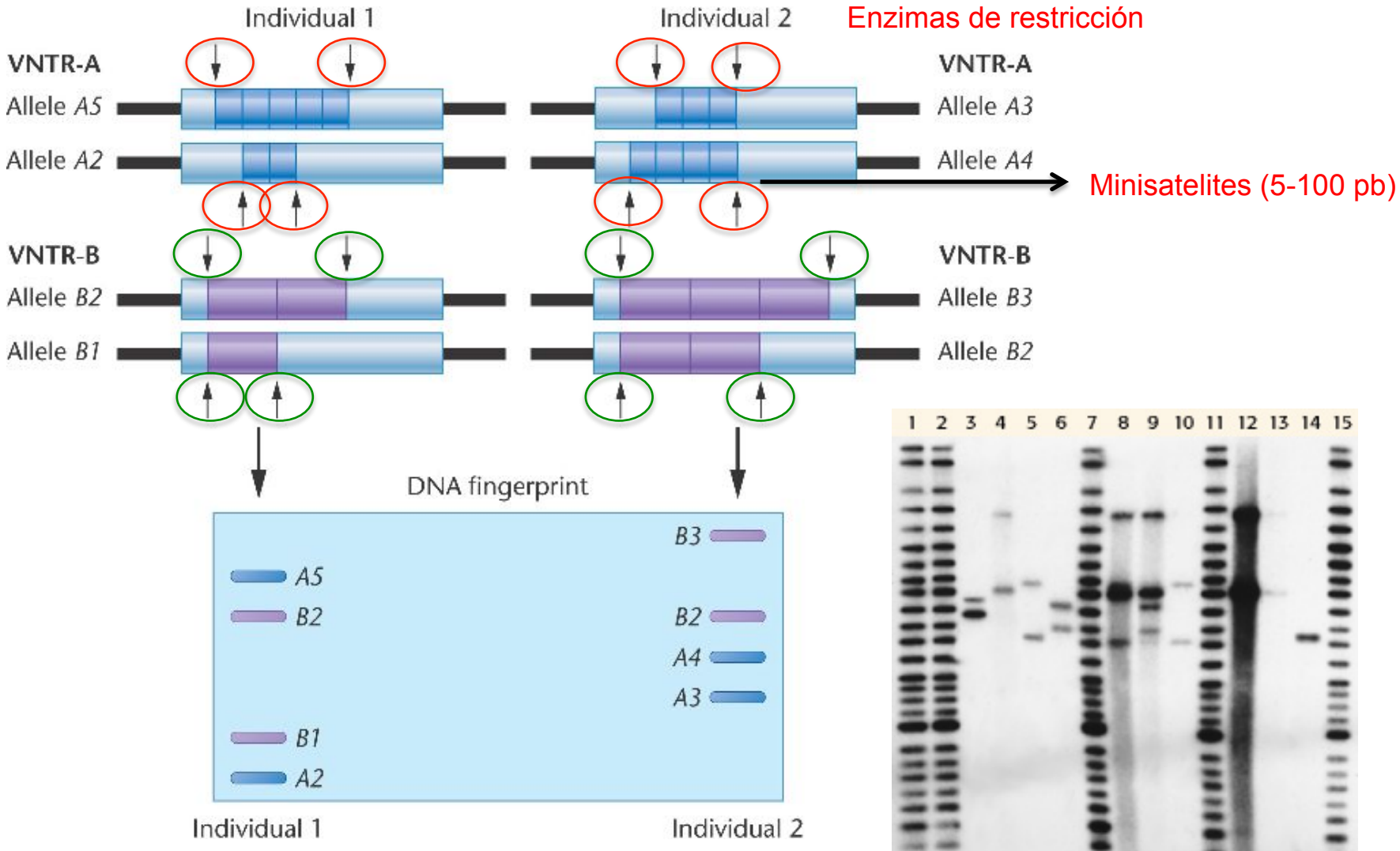
©1985 Nature Publishing Group

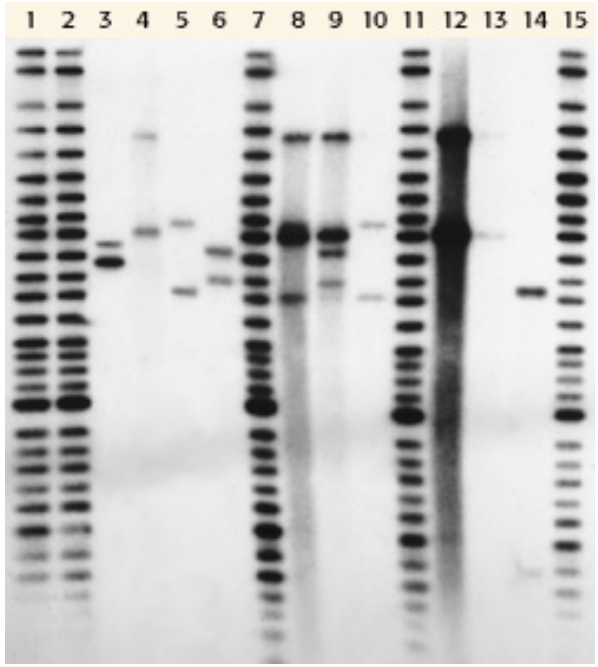
GOBIERNO DE ESPAÑA MINISTERIO DE JUSTICIA

INTCF CIENCIAS FORENSES

Regiones hipervariables repetitivas: VNTR (1986)

Enzimas de **restricción**



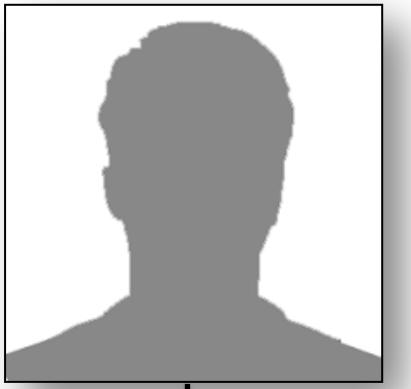


El inicio “caso Pitchfork” (1986)

- ✓ Ambas víctimas han sido agredidas sexualmente
- ✓ Presentan signos de violencia
- ✓ Se recuperan restos de semen del cuerpo de las víctimas

1983- Noviembre
Aparece muerta
Lynda Mann (15a)

1986- Julio
Aparece muerta
Dawn Ashworth(17a)

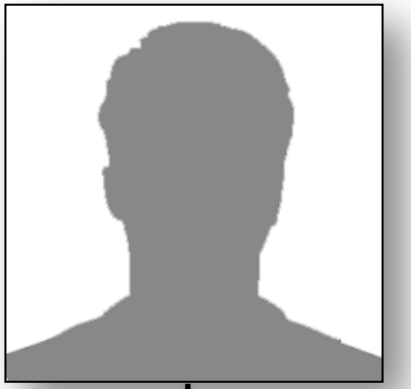


1986- Agosto
Richard Buckland(17a)
Arrestado
Reconoce el segundo delito

GOBIERNO DE ESPAÑA MINISTERIO DE JUSTICIA

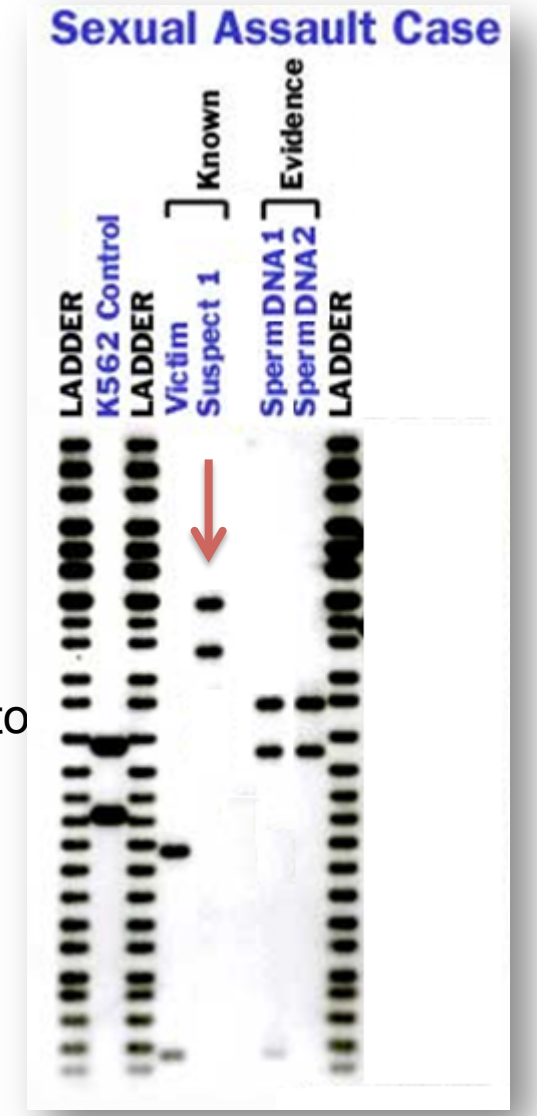
INTCF CIENCIAS FORENSES

El inicio “caso Pitchfork”(1986)



1986- agosto

Richard Buckland(17a)
Arrestado
Reconoce el segundo delito



1986- 21 noviembre

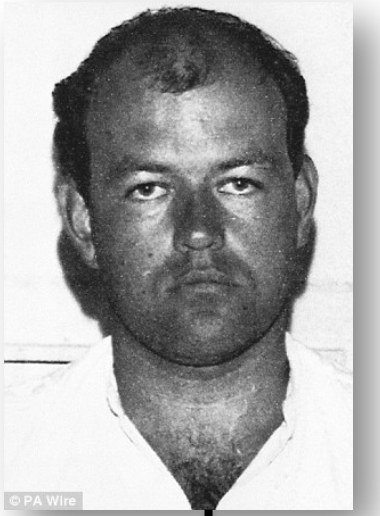
Richard Buckland
Exonerado

GOBIERNO DE ESPAÑA MINISTERIO DE JUSTICIA INTCF CIENCIAS FORENSES

El inicio “caso Pitchfork” (1986)

1987- Tipaje masivo
4000 hombres (17-34a)
Enderby, Narborough, Littlethorpe
No coincidencias

1987- Ian Kelly
Suplanta
la identidad
de una persona

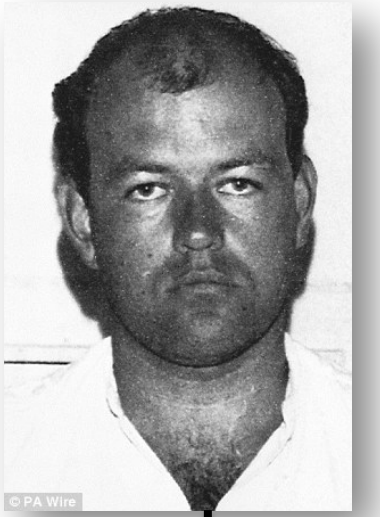


1987-19 septiembre
arrestado
Colin Pitchfork

GOBIERNO DE ESPAÑA MINISTERIO DE JUSTICIA

INCIF CIENCIAS FORENSES

El inicio “caso Pitchfork”



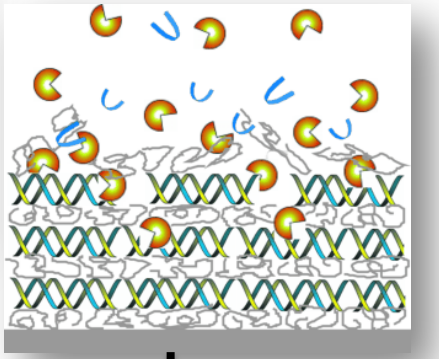
1988- Colin Pitchfork es condenado a 30 años de prisión

GOBIERNO DE ESPAÑA MINISTERIO DE JUSTICIA

INTCF CIENCIAS FORENSES

Primeros problemas: primeras soluciones (1988)

Cantidad de ADN

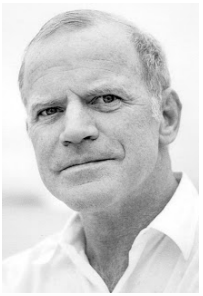


Calidad de ADN

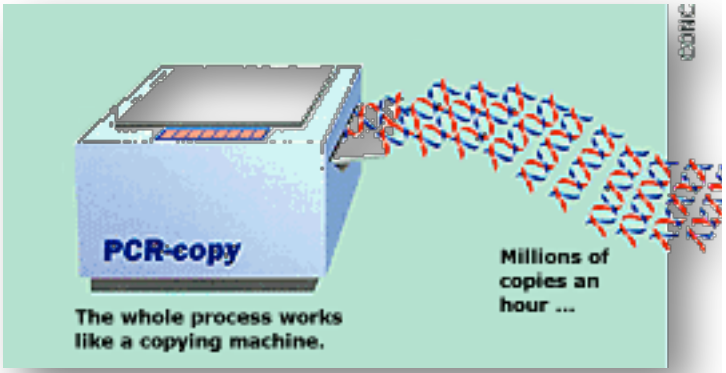
→**Humedad**

→ Proliferación bacteriana

→ Nucleasas



K Mullis
(1983)



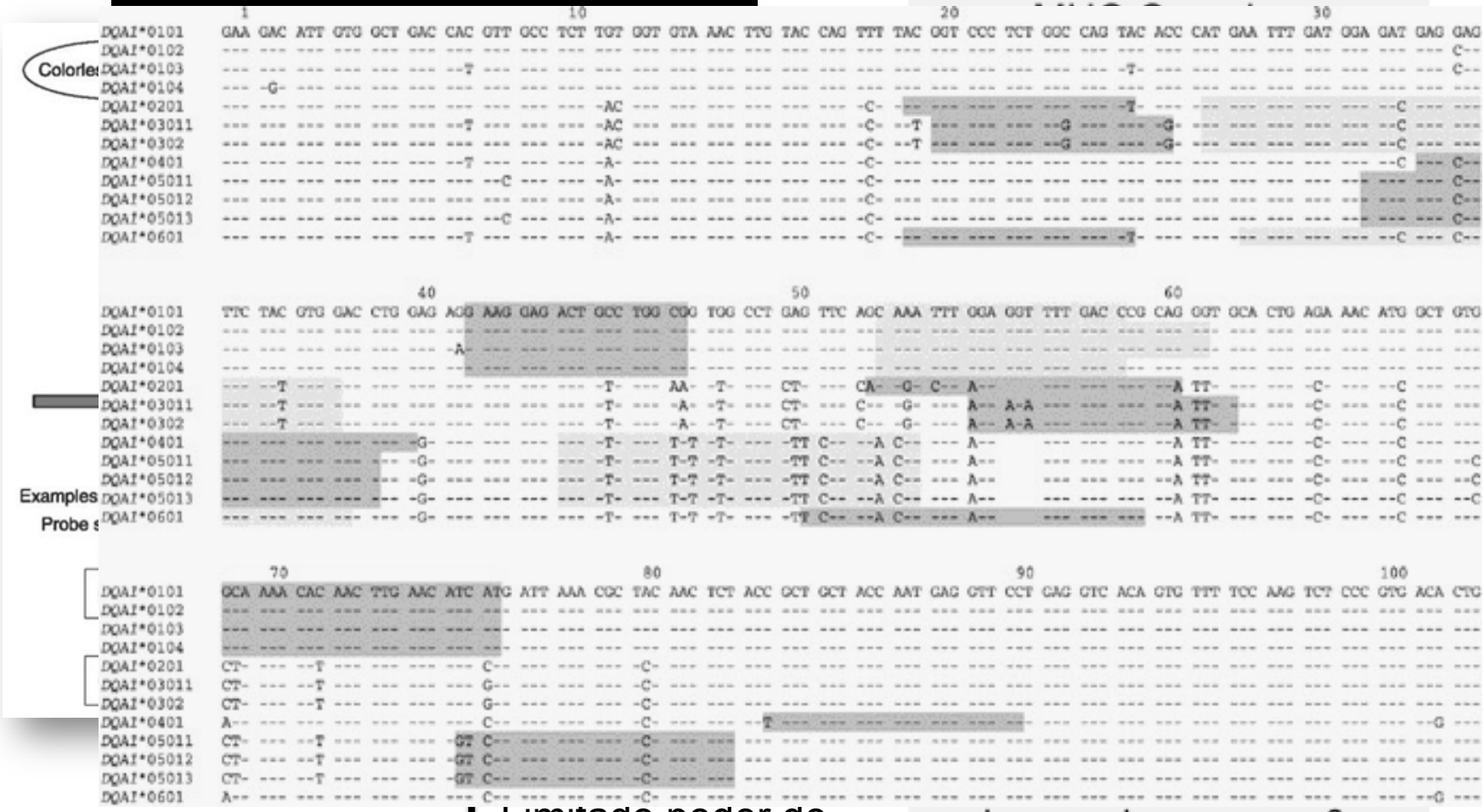
1987- PCR
- Cantidades mínimas de ADN (100 pg)
- ADN degradado

GOBIERNO DE ESPAÑA MINISTERIO DE JUSTICIA

INTCF CIENCIAS FORENSES

PCR: HLA DQA1 polimorfismos de secuencia (1988)

Polimorfismo de posición

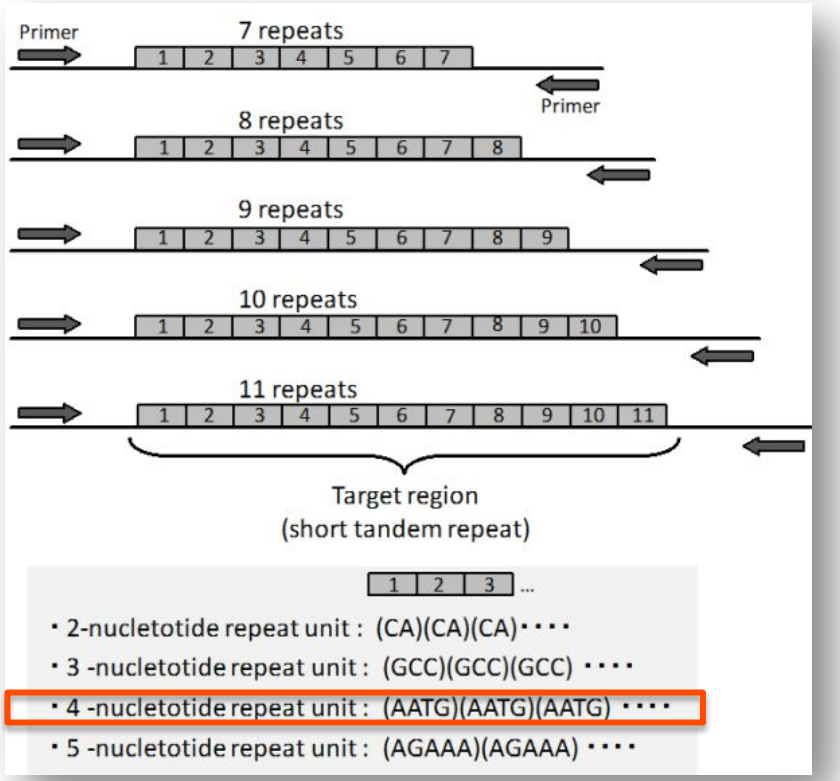


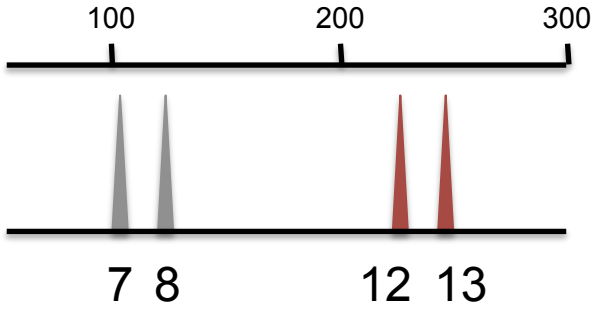
Limitado poder de discriminación

GOBIERNO DE ESPAÑA
MINISTERIO DE JUSTICIA
INTCF CIENCIAS FORENSES

PCR: STRs (1992)

Microsatelites 2-5 pb) -STRs-





Tamaño *repeat*: 4 pb

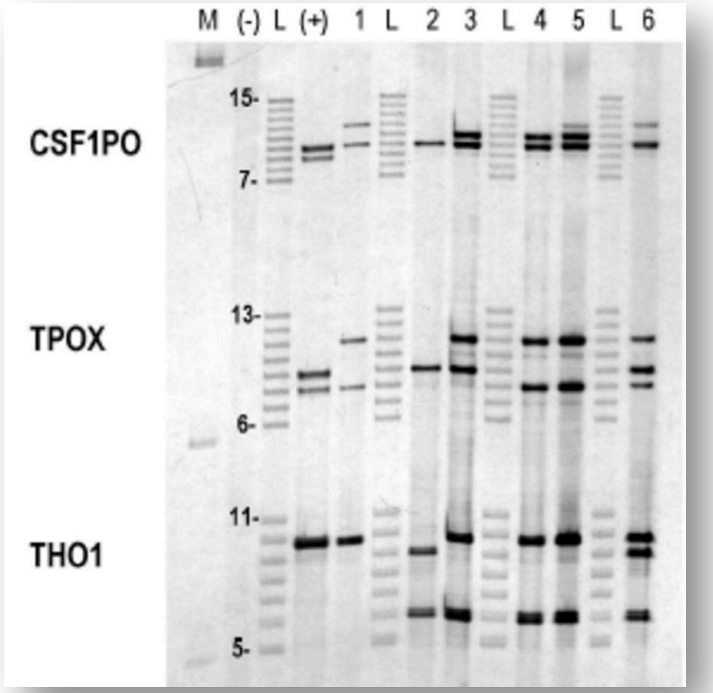
Tamaño Total: 100-400 pb

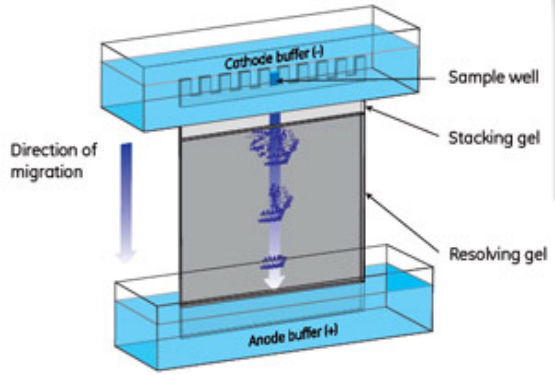
- ✓ Mejora ante la degradación
- ✓ Alto polimorfismo

GOBIERNO DE ESPAÑA MINISTERIO DE JUSTICIA

INCIENCIAS FORENSES

PCR: STRs (1992→2014)





- Técnica engorrosa
- Lenta
- Problemas de estandarización

1992

2014

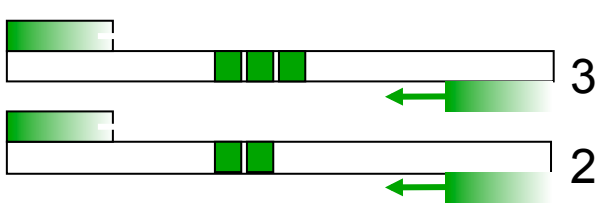
- Estandarización mundial de STRs
- Resolución mediante EC
  - ✓ Rapidez (20 min)
  - ✓ Precisión(1pb)
  - ✓ Resolución

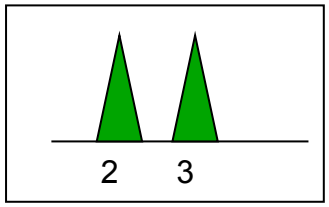
PCR: multiplex PCR

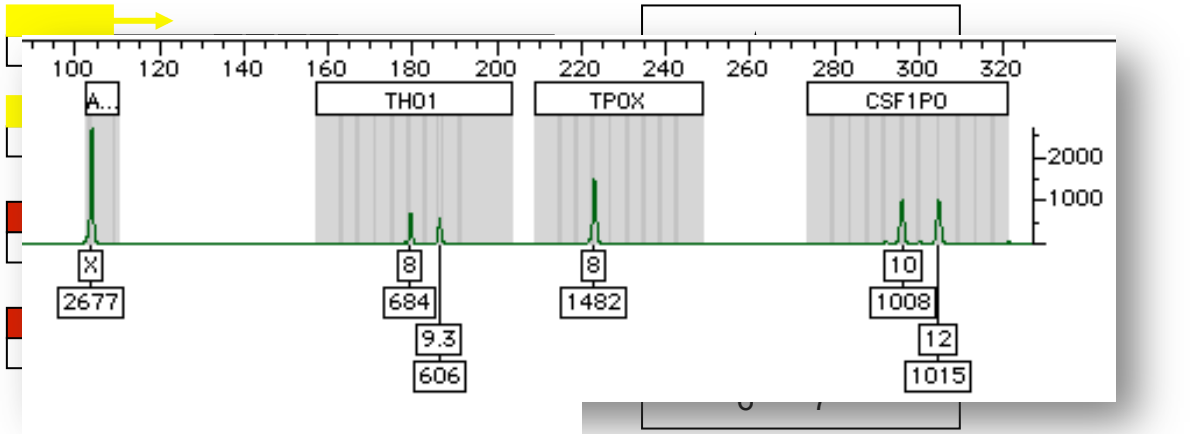
Multiplex PCR

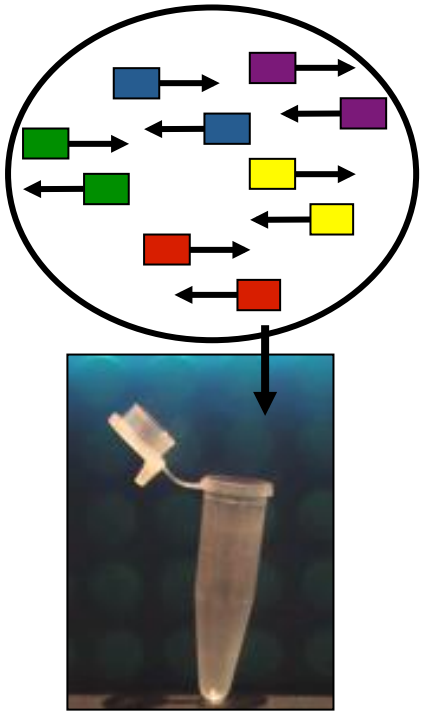
Mediante la PCR se pueden amplificar simultáneamente varios fragmentos seleccionados del genoma.

Cromosomas homólogos





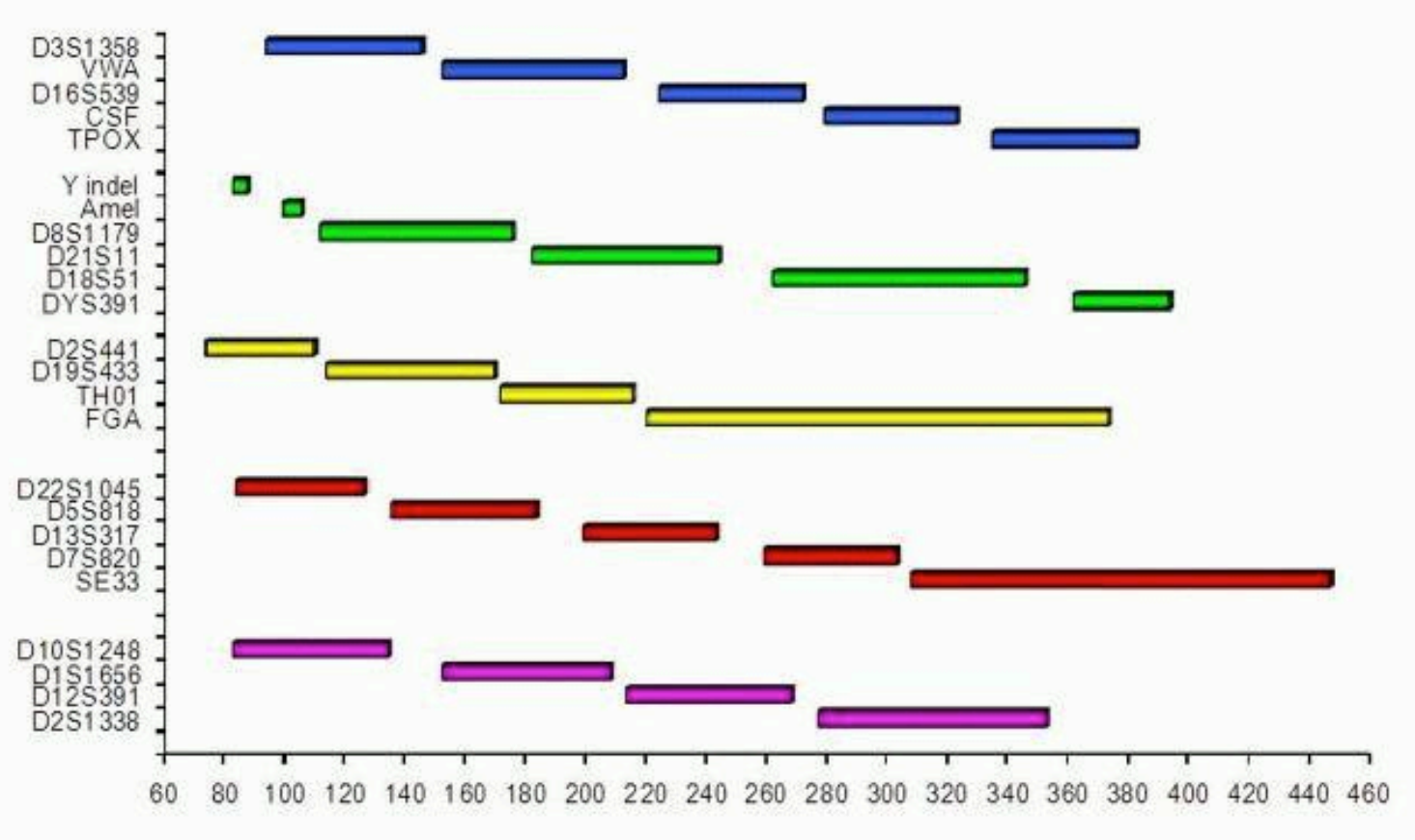




LocusA	90-130pb
LocusB	150-200pb
LocusC	210-290pb

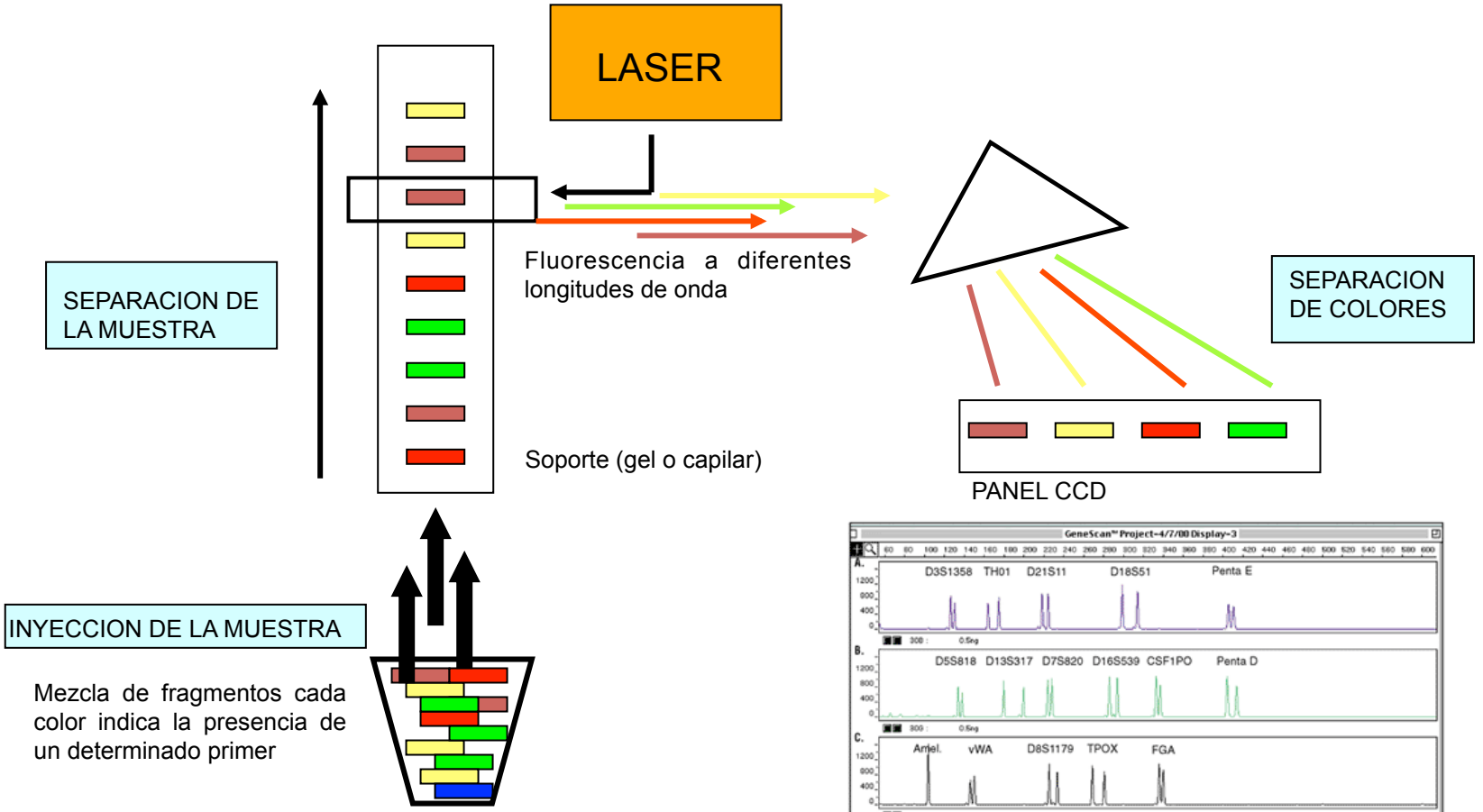
Permite amplificar simultaneamente hasta 20-25 marcadores STRs en la misma reacción

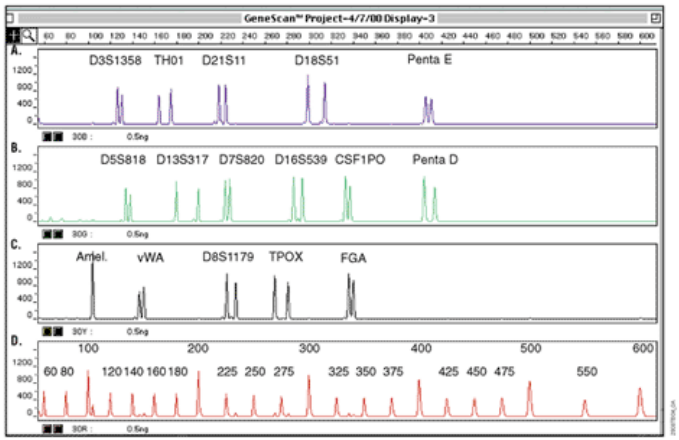
PCR: multiplex PCR



- 22 STRs
- 4700 EUR /200 reacciones
- Poder de discriminación: 1 en 3 x 10^{26}
- 100 pg (6-7 pg/cel→ 15 cels)

PCR: electroforesis capilar





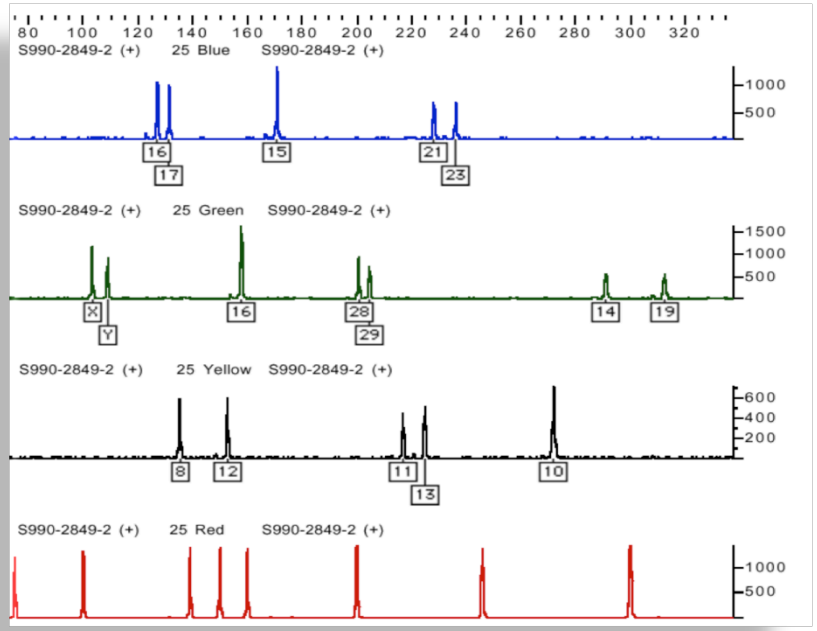
STR A 120-154pb
STR B 180-198pb
STR C 224-276pb
} Marcado con

STR D 110-144pb
STR E 230-278pb
STR F 341-396pb
} Marcado con

STR G 210-290pb
STR H 330-398pb
STR I 441-496pb
} Marcado con

¿Qué es un perfil genético?

Perfil genético STRs:
Código alfa-numérico “anónimo” con muy alto poder de discriminación individual.



Registro laboratorio

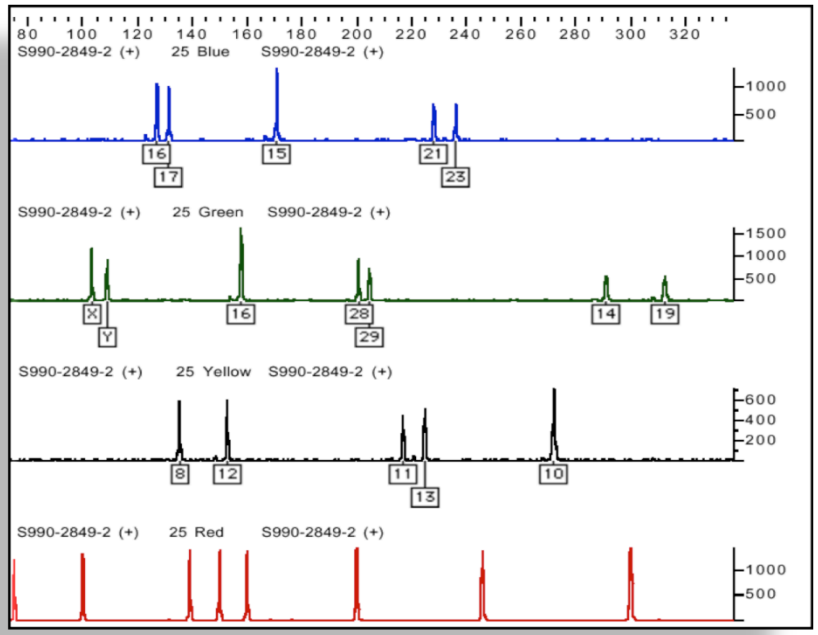
D8S1179	13
D21S11	30
D7S820	10-11
CSF1PO	10-12
D3S1358	14-15
TH01	8-9.3
D13S317	11
D16S539	11-12
D2S1338	19-23
D19S433	14-15
vWA	17-18
TPOX	8
D18S51	15-19
AMEL	X
D5S818	11
FGA	23-24

Registro dictámenes

Perfil genético

Perfil genético STRs:

✓Alto poder discriminativo: > 1 en 2 x 10^{20}
✓Escasa cantidad de ADN: 5-80 pg (15-20 células)
✓No revelador de características fenotípicas del individuo.



Perfil genético STRs:

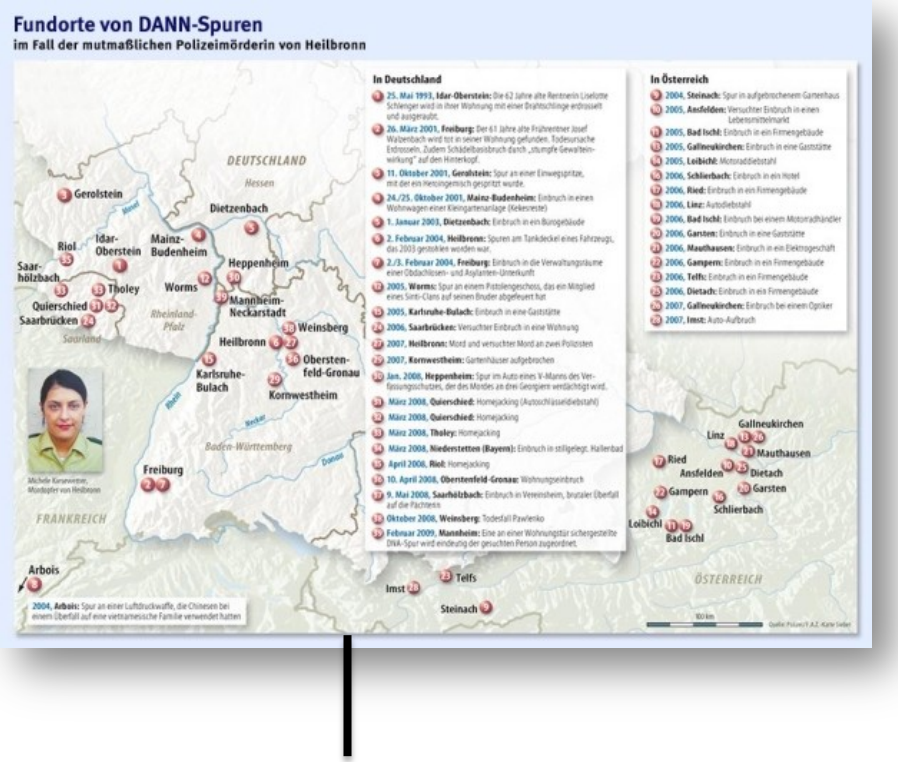
✓Por si solo no tiene trascendencia
✓Es idéntico en todas las células de un individuo
✓Es distinto de unos individuos a otros (salvo gemelos univetelinos).
✓Recuperado de distintos soportes

La otra cara de la genética forense “phanton-Heilbron”

En 2007 la oficial de policia **Michele Kiesewetter** es asesinada en Heilbronn (Alemania).

Restos hallados en el asiento trasero del coche revelan la existencia de ADN procedente de mujer.

La otra cara de la genética forense “phanton-Heilbron”



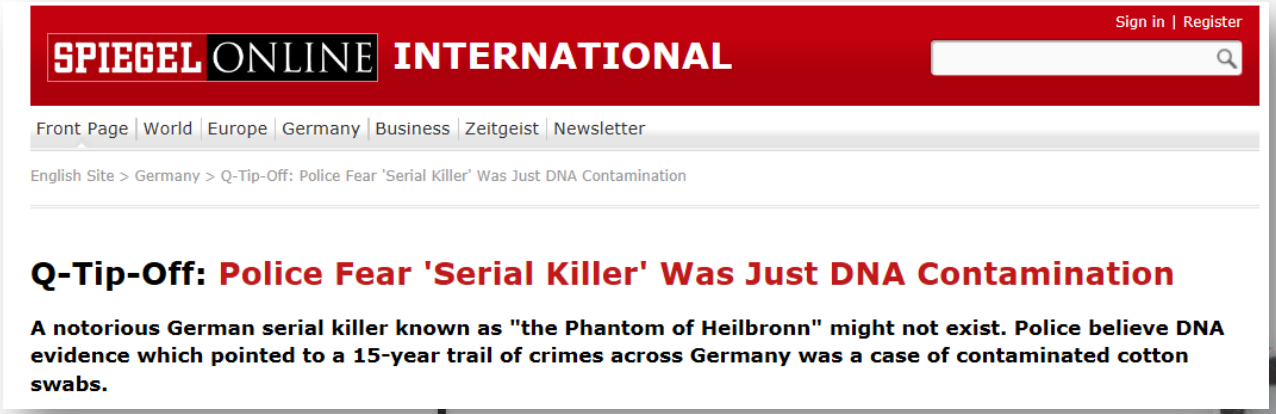
El perfil genético coincidia con otros perfiles procedentes de actos delictivos muy variados (robos, crimenes, estorsiones, ¿agresiones sexuales?) cometidos desde 1993 .

¿Transexual?

2009, Francia, cadaver por identificar de varón

Se le atribuian más de 40 delitos cometidos en Alemania, Austria, Francia.

La otra cara de la genética forense “phanton-Heilbron”



Una empleada de la empresa suministradora de material a los laboratorios forenses (**Greiner Bio-One International AG**) contaminó las muestras.

Grupo neonazi acusado del asesinato

ISO 18385:2016

Minimizing the risk of human DNA contamination in products used to collect, store and analyze biological material for forensic purposes -- Requirements

Legislación: calidad de la pericia en genética forense

2005

Schengen III

Prüm 27/05/2005

- ✓ Creación de ficheros nacionales de análisis del ADN
- ✓ Consulta automatizada de los perfiles de ADN

2007

09/10/07

17634 LEY ORGÁNICA 10/2007, de 8 de octubre, reguladora de la base de datos policial sobre identificadores obtenidos a partir del ADN.

- ✓Acreditación de laboratorios
- ✓…

2008

11/12/08

19992 REAL DECRETO 1977/2008, de 28 de noviembre, por el que se regula la composición y funciones de la **Comisión Nacional para el uso forense del ADN.**

2009

- **Superar Ejercicios de suficiencia**
- **Acreditación ENAC**

ACTOS ADOPTADOS EN APLICACIÓN DEL TÍTULO VI DEL TRATADO UE

DECISIÓN MARCO 2009/905/JAI DEL CONSEJO

de 30 de noviembre de 2009

sobre acreditación de prestadores de servicios forenses que llevan a cabo actividades de laboratorio

- **Fecha Límite: 30 de noviembre de 2013**

Interés de las bases de Datos de ADN de uso Forense

- ✓ Resolver hechos delictivos y acciones humanitarios

- ✓ Prevenir acciones criminales
- ✓ Exhonerar y resolución de “*cold cases*”
- ✓ Ahorro económico y de tiempo

GOBIERNO DE ESPAÑA MINISTERIO DE JUSTICIA INTCF CIENCIAS FORENSES

Interés de las bases de Datos de ADN de uso Forense

✓ De Interés Criminal

Indicios biológicos y Sospechosos/condenados

✓ De Identificación de Desaparecidos y Cadáveres

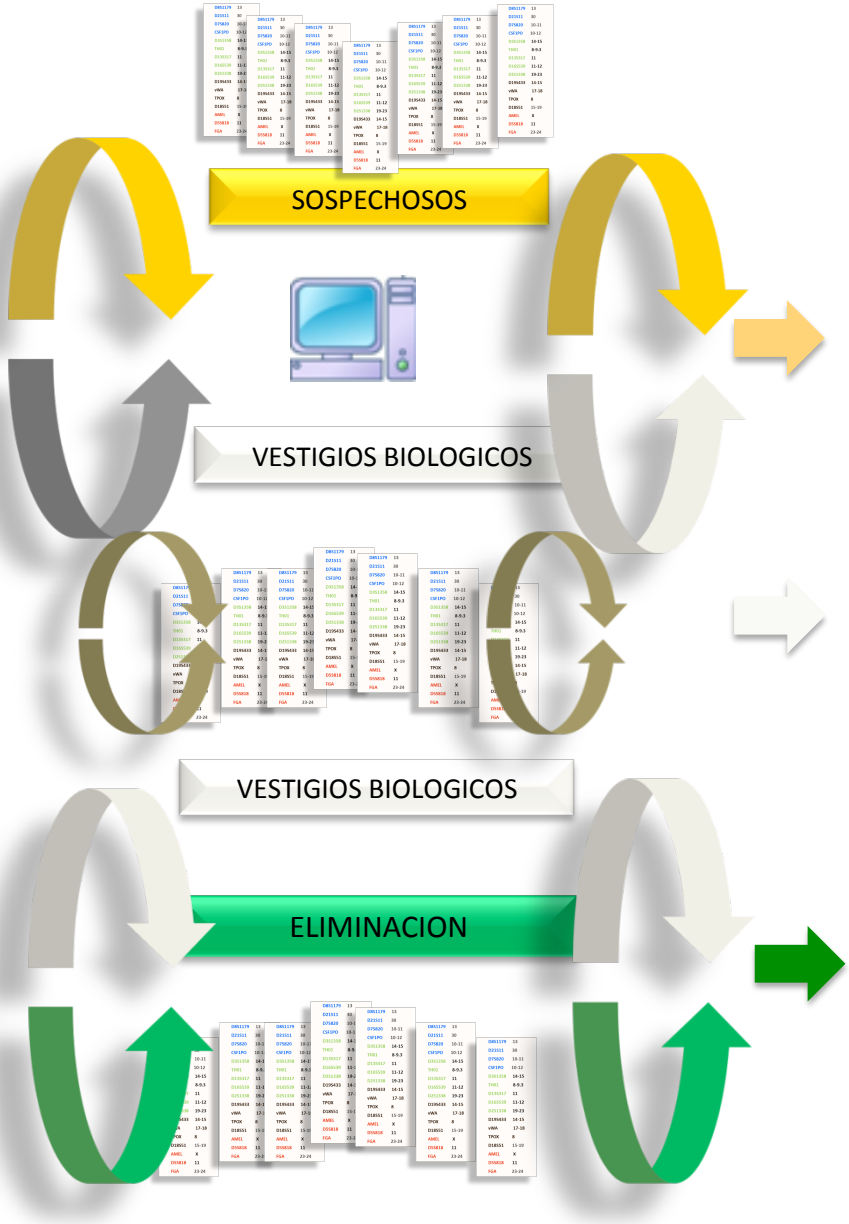
Grandes Catástrofes /Fosas Comunes /Inmigración

✓ Adopciones Irregulares y Sustracción de Recién Nacidos

Familiares/restos exhumados

GOBIERNO DE ESPAÑA MINISTERIO DE JUSTICIA INTCF CIENCIAS FORENSES

Funcionamiento de la Bases de Datos de ADN (Criminal)



Coincidencias: Personas-indicios

Coincidencias: Indicios-indicios

Contaminaciones accidentales

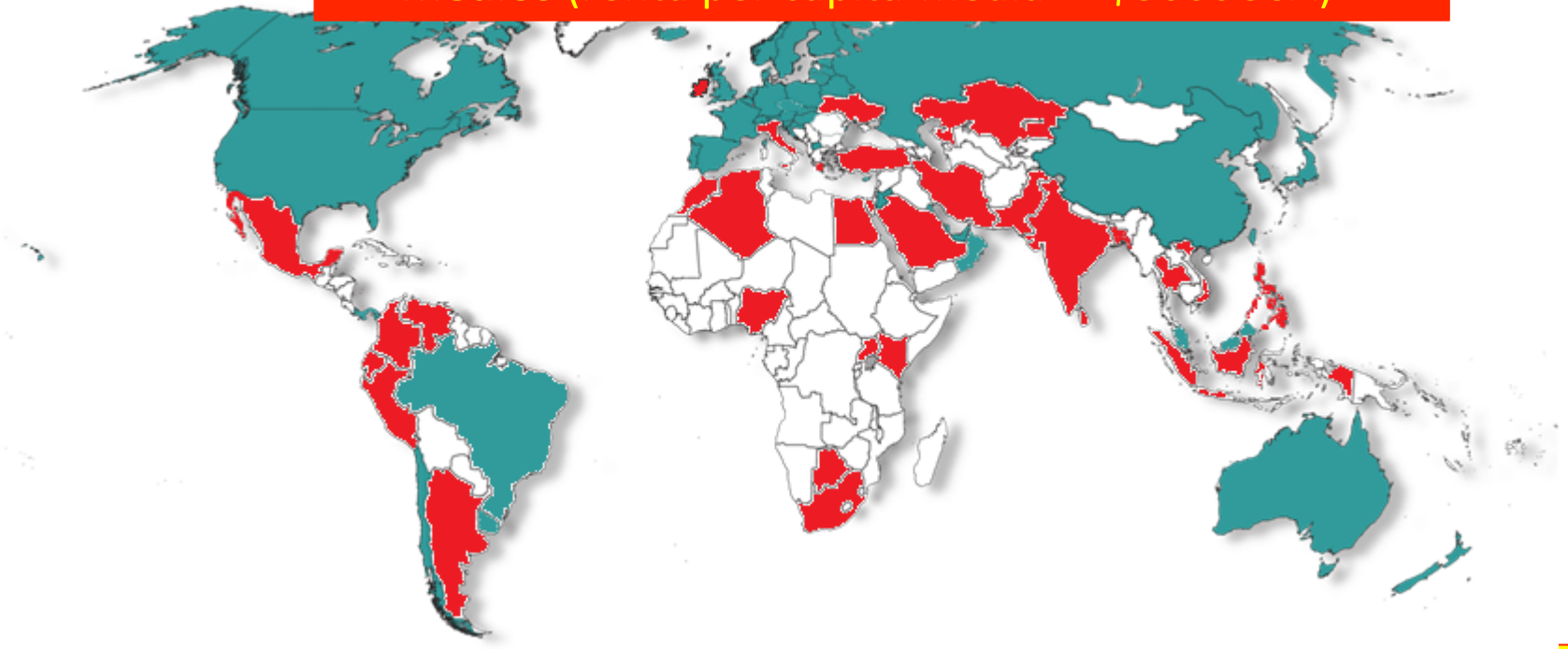
Datos de ADN de uso Forense: Situación actual mundial

Más de 60 millones de muestras, en bases de datos de 50 paises (junio 2015)

Australia
Austria
Bahrain
Barbados
Belarus
Belgium
Brazil
Canada
Czech Republic
Chile
China
Croatia
Cyprus
Denmark
Estonia
Finland
France
Germany
Hong Kong
Hungary
Iceland
Israel
Japan
Jordan
Kuwait
Latvia
Lithuania
Netherlands
New Zealand
Macedonia
Malaysia
Mauritius
Norway
Oman
Panama
Poland
Portugal
Qatar
Russia
Slovenia
Slovakia
Singapore
South Korea
Spain
Sweden
Switzerland
Taiwan
United Arab Emirates
United Kingdom
United States
Uruguay

Datos de ADN de uso Forense: Situación actual mundial

- ✓ **Legislación**
- ✓ **Medios** (renta per capita-media- < $5000USA)



Estima: 100-150 millones de muestras de 80 paises (2015-2025)

India	Philippines	Italy	Algeria	Sri Lanka
Indonesia	Vietnam	South Africa	Uganda	Kazakhstan
Pakistan	Iran	Colombia	Morocco	Ecuador
Nigeria	Egypt	Kenya	Saudi Arabia	Greece
Bangladesh	Turkey	Argentina	Peru	Ireland
Mexico	Thailand	Ukraine	Venezuela	Botswana

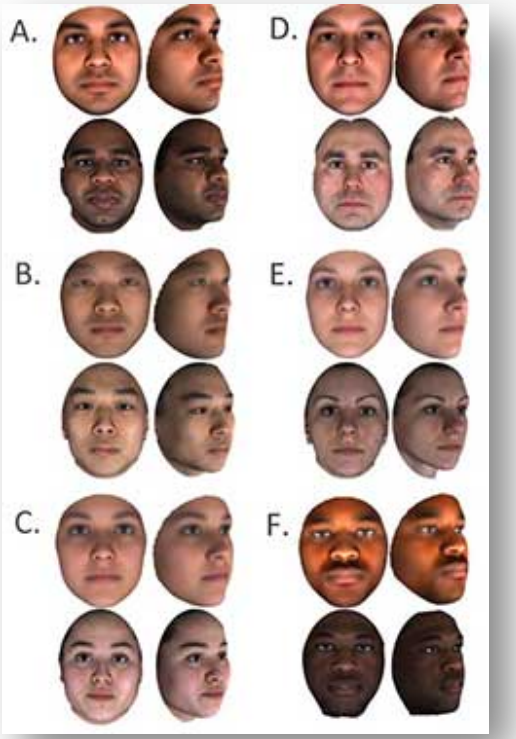
¿Ciencia ficción o realidad?

OPEN ACCESS Freely available online

PLOS | GENETICS

Modeling 3D Facial Shape from DNA

Peter Claes[1], Denise K. Liberton[2], Katleen Daniels[1], Kerri Matthes Rosana[2], Ellen E. Quillen[2], Laurel N. Pearson[2], Brian McEvoy[3], Marc Bauchet[2], Arslan A. Zaidi[2], Wei Yao[2], Hua Tang[4], Gregory S. Barsh[4,5], Devin M. Absher[5], David A. Puts[2], Jorge Rocha[6,7], Sandra Beleza[4,8], Rinaldo W. Pereira[9], Gareth Baynam[10,11,12], Paul Suetens[1], Dirk Vandermeulen[1], Jennifer K. Wagner[13], James S. Boster[14], Mark D. Shriver[2*]



¿Ciencia ficción o realidad?

- ✓ Limitaciones legales
- ✓ Privacidad de las personas
- ✓ Legislación nacional

GOBIERNO DE ESPAÑA MINISTERIO DE JUSTICIA

INTCF CIENCIAS FORENSES

GOBIERNO DE ESPAÑA MINISTERIO DE JUSTICIA

INTCF CIENCIAS FORENSES

Gracias por su atención